



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUIGI BERTOLACCINI SCOLIN

**SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DO FUNGO  
ENTOMOPATOGÊNICO DE LAGARTAS *Metarhizium rileyi* A  
FUNGICIDAS**

---

Londrina  
2023

LUIGI BERTOLACCINI SCOLIN

**SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DO FUNGO  
ENTOMOPATOGÊNICO DE LAGARTAS *Metarhizium rileyi* A  
FUNGICIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanetti  
Canteri  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Cláudia Vieira Godoy

Londrina  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Scolin, Luigi Bertolaccini .

Sensibilidade de isolados do fungo entomopatogênico de lagartas *Metarhizium rileyi* a fungicidas / Luigi Bertolaccini Scolin. - Londrina, 2023.  
46 f.

Orientador: Marcelo Giovanetti Canteri.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2023.  
Inclui bibliografia.

1. Controle biológico - Tese. 2. Inibidores da desmetilação - Tese. 3. Inibidores da quinona externa - Tese. 4. Metil benzimidazol carbamatos - Tese. I. Giovanetti Canteri, Marcelo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 63

LUIGI BERTOLACCINI SCOLIN

**SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DO FUNGO  
ENTOMOPATOGENICO DE LAGARTAS *Metarhizium rileyi* A  
FUNGICIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Coorientadora: Dra. Cláudia Vieira Godoy  
Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária – EMBRAPA

---

Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez  
Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária – EMBRAPA

---

Dr. Maurício Conrado Meyer  
Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária – EMBRAPA

Londrina, 23 de Fevereiro de 2023.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me mostrar o melhor caminho sempre.

Aos meus pais Valdemir Scolin e Junia Maria Prezoto Bertolaccini, e minhas irmãs Eliza Maria Bertolaccini Scolin e Luiza Bertolaccini Scolin que motivaram e guiaram minha trajetória.

Aos meus orientadores, Cláudia Vieira Godoy, por ser um exemplo de profissional a ser seguido, um modelo de pessoa determinada, eficiente, inteligente, sempre incentivando a buscar o meu melhor. Ao Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri, pelo conhecimento transmitido, auxílio e suporte durante execução dos trabalhos.

Ao técnico do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Soja, Allan Misael Flausino pela amizade, paciência, esforço e empenho nos trabalhos conduzidos juntos.

Aos professores da Universidade Estadual de Londrina, especialmente à Profa. Inês Cristina de Batista Fonseca e ao Prof. Guilherme Biz.

Aos pesquisadores da Embrapa Soja, principalmente Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez, Dr. Maurício Conrado Meyer e Dra. Ivani de Oliveira Negrão Lopes.

À Tamires Doroteo de Souza por facilitar o trabalho pelas indicações e experiência prática na área de entomologia.

Aos técnicos do laboratório, Nilson Valentin, Luiz Alexandre, Gisele e Sérgio pela ajuda e ensinamentos.

Aos estagiários Adélcio, Jacqueline e Thiago pela ajuda e companheirismo nos trabalhos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do Mestrado.

SCOLIN, Luigi Bertolaccini. **Sensibilidade de isolados do fungo entomopatogênico de lagartas *Metarhizium rileyi* a fungicidas.** 2023. 46 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

## RESUMO

Na cultura da soja, as aplicações de fungicidas foliares atingem não somente os organismos alvos mas também os que não são alvos, como entomopatógenos que suprimem naturalmente populações de inseto-praga. Seu uso intensivo pode diminuir a prevalência do fungos entomopatogênicos causando atraso na progressão epizootica do mesmo e aumentando a densidade de pragas na lavoura. Um número crescente de relatos de resistência de fungos alvos aos fungicidas utilizados na cultura vem ocorrendo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de fungicidas no fungo não alvo *Metarhizium rileyi*, patógeno de lagartas, buscando encontrar populações menos sensíveis que possam ser utilizadas no controle biológico. Foi avaliada a sensibilidade do fungo a fungicidas dos grupos: metil benzimidazol carbamatos (MBC), inibidores da quinona externa (IQe) e inibidores da desmetilação (IDM) por meio da germinação de esporos. Foram avaliados 39 isolados de *M. rileyi*, depositados na Coleção Micológica da Embrapa Soja. O fungicida carbendazim (MBC) foi avaliado por meio de dose discriminatória na concentração de 1 ppm. Picoxistrobina e azoxistrobina (IQe) foram avaliados nas doses de 0,01; 0,1 e 1 ppm. Os fungicidas tebuconazol e protioconazol (IDM) foram avaliados nas doses de 0; 0,1; 1; 2; 5 e 10 ppm para determinação da concentração efetiva para reduzir 50% da germinação (CE50). Trinta e cinco isolados foram considerados resistentes ao ingrediente ativo carbendazim e todos os isolados foram considerados sensíveis à picoxistrobina e azoxistrobina. Para protioconazol e tebuconazol as CE50 médias foram 0,34 ppm e 0,77 ppm, respectivamente. Somente um isolado (Nr 424, 2003) apresentou CE50  $\geq$  1 ppm para o ingrediente ativo protioconazol e 18 isolados para tebuconazol, sendo cinco obtidos antes de 1996 e 13 a partir de 1996. Um único isolado apresentou CE50 superior a 2 ppm para tebuconazol (Nr 152, 1996).

**Palavras-chave:** Controle biológico. Inibidores da desmetilação. Inibidores da quinona externa. Metil benzimidazol carbamato.

SCOLIN, Luigi Bertolaccini. **Sensitivity of isolates of the entomopathogenic fungus from caterpillars *Metarhizium rileyi* to fungicides**. 2023. 46p. Dissertation (Master in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina, 2023.

### ABSTRACT

In soybean, foliar fungicide applications reach not only target organisms but also non-target organisms, such as entomopathogens that naturally suppress insect pest populations. Its intensive use can reduce the prevalence of entomopathogenic fungi causing a delay in the epizootic progression and increasing the density of pests in the crop. An increasing number of reports of resistance of target fungi to the fungicides used in the crop are occurring. The objective of this work was to evaluate the effect of fungicides on non-target fungi *Metarhizium rileyi*, a pathogen of caterpillars, aiming to find less sensitive populations that could be used in biological control. It was assessed the sensitivity of the fungus to fungicides from methyl benzimidazole carbamates (MBC), demethylation inhibitors (DMI), and quinone outside inhibitors (QoI) through spore germination. We evaluated 39 isolates of *M. rileyi* from the Embrapa Soybean Mycological Collection. The fungicide carbendazim (MBC) was evaluated using a discriminatory dose at a concentration of 1 ppm. Picoxystrobin and azoxystrobin (QoI) were evaluated at doses of 0.01, 0.1, and 1 ppm. Tebuconazole and prothioconazole (DMI) were assessed at 0, 0.1, 1, 2, 5, and 10 ppm to determine the effective concentration to reduce the spore germination in 50% (CE50). Thirty-five isolates were resistant to carbendazim. All isolates were sensitive to picoxystrobin and azoxystrobin. Mean CE50 were 0.34 and 0.77 ppm, for prothioconazole and tebuconazole, respectively. Only one isolate (Nr 424, 2003) presented an CE50  $\geq$  1 ppm for prothioconazole and 18 isolates for tebuconazole, five of which were obtained before 1996, 13 from 1996. A single isolate showed an CE50 > 2 ppm for tebuconazole (Nr 152, 1996).

**Key words:** Biological control. Demethylation Inhibitors. Quinone outside inhibitors. Methyl benzimidazole carbamate.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>10</b>
2.1 Cultura da soja.....	10
2.2 Uso de fungicidas e a seleção de resistência .....	11
2.3. <i>Metarhizium rileyi</i> e importância para o controle biológico de pragas.....	13
2.4. Seleção para isolados resistentes.....	16
2.5. Mecanismo de resistência dos fungicidas da classe MBC .....	18
2.6. Mecanismo de resistência dos fungicidas da classe IQe.....	18
2.7. Mecanismo de resistência dos fungicidas da classe IDM.....	19
<b>3. ARTIGO A: Sensibilidade de isolados do fungo entomopatogênico de lagartas</b> <b><i>Metarhizium rileyi</i> a fungicidas.....</b>	<b>20</b>
3.1 Resumo.....	20
3.2 Abstract.....	21
3.3 Introdução.....	22
3.4 Material e Métodos .....	23
3.4.1 Amostras e manutenção dos isolados de <i>Metarhizium rileyi</i> .....	23
3.4.2 Inibição do crescimento micelial de <i>Metarhizium rileyi</i> in vitro .....	25
3.5 Resultados e discussão .....	27
3.6 Conclusões.....	37
<b>4 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de grãos ocupa destaque na agricultura brasileira, principalmente a cultura de soja, porém, existem diversos fatores bióticos e abióticos que podem afetar a sua produtividade. Entre os fatores bióticos estão as doenças e pragas que podem diminuir a produtividade da cultura (SEIXAS et al., 2020).

Mais de 40 doenças já foram relatadas na cultura, em vários estágios de desenvolvimento, afetando raízes, pecíolos e caules, folhas e vagens. O manejo integrado de doenças (MID) é a melhor opção para evitar danos e tem como base o controle cultural, genético, químico e biológico (SEIXAS et al., 2020).

A utilização de fungicidas na cultura da soja se intensificou com a entrada do fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd, causador da ferrugem-asiática da soja, no Paraguai e no Brasil, em 2001 e que se disseminou para todas as regiões produtoras do País (YORINORI et al., 2005). A média de aplicações de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática e de outras doenças na cultura por ciclo, foi de, aproximadamente, 3,4 por hectare nas últimas safras (GODOY et al., 2020). Durante as aplicações, todos os organismos que estão presentes na cultura (alvos e não alvos) são expostos a essas aplicações. Um número crescente de relatos de fungos alvos resistentes a fungicidas vem ocorrendo na cultura da soja pelo excesso de utilização de fungicidas, como *Cercospora* spp. (MELLO et al., 2021), *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C. T. Wei (XAVIER et al., 2013; TERAMOTO et al., 2017; FRAC, 2021) e *P. pachyrhizi* (SCHMITZ et al., 2014; KLOSOWSKI et al., 2016; SIMÕES et al., 2018). Entre os fungos não alvos, estão os entomopatogênicos. Fungos entomopatogênicos são importantes agentes de controle biológico dentro do manejo de pragas e o uso constante de fungicidas pode suprimir suas populações (SOSA-GÓMEZ et al., 2003; LOPES et al., 2022).

Se por um lado a resistência a fungicidas pode ser prejudicial no controle de doenças, selecionando populações de fungos cada vez menos sensíveis ou resistentes aos fungicidas, por outro lado, do ponto de vista de populações de fungos utilizadas no controle biológico, ela pode ser benéfica. Isolados de fungos menos sensíveis aos fungicidas, quando selecionados, apresentam uma vantagem adaptativa para serem liberados e utilizados no controle biológico.

Dentre os fungos entomopatogênicos utilizados no controle

biológico, *Metarhizium rileyi* (Farl.) Kepler, S.A. Rehner & Humber 2014 destaca-se na cultura da soja por parasitar a família Noctuidae. O fungo possui grande importância no controle natural das lagartas da soja no Brasil e no resto do mundo. Porém, a utilização de fungicidas pode atrasar o aparecimento de epizootias do fungo *M. rileyi* de 2 a 14 dias no controle de populações de *Anticarsia gemmatalis* (SOSA-GÓMEZ et al., 2003).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de isolados de *M. rileyi*, a fungicidas dos grupos químicos mais utilizados no controle de doenças. Dessa forma, avaliou-se a sensibilidade de isolados de *M. rileyi* a fungicidas do grupo dos metil benzimidazol carbamatos (MBC), inibidores da quinona externa (IQe) e inibidores da desmetilação (IDM). Os isolados provêm da Coleção Micológica da Embrapa Soja e da Embrapa Cenargen, sendo pré-selecionados para maior patogenicidade em bioensaios.

A dissertação será apresentada na forma de artigo científico:

**Artigo A:** “Sensibilidade de isolados do fungo entomopatogênico de lagartas *Metarhizium rileyi* a fungicidas”.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cultura da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.], é uma planta da família Fabaceae originária da China, sendo umas das culturas mais amplamente difundidas no mundo (AZEVEDO,1993; BORÉM, 1999). É uma cultura de grande importância mundial, podendo ser comercializada como grão, farelo e óleo, pois o grão possui ao redor de 20% de óleo na sua composição. Possui importantes características nutricionais para a alimentação humana e animal, com cerca de 40% de proteínas, além de fibras e gorduras insaturadas. Também é importante para a produção de biodiesel, por ser uma fonte de energia renovável que substitui os derivados de petróleo e reduz a emissão de gases que agravam o efeito estufa (RAMOS; NASCIMENTO; SILVA, 2010; HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014; ANUÁRIO BRASILEIRO DE SOJA, 2018).

O Brasil é o maior produtor mundial de soja. Na safra 2021/2022 produziu ao redor de 124.047 milhões de toneladas em uma área de 40,9 milhões de hectares e média de produtividade de 3.029 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2022).

Um dos principais fatores para o sucesso da soja no Brasil foi o desenvolvimento de cultivares adaptadas a baixas latitudes, que permitiu a expansão da cultura para a região do Cerrado, responsável por mais de 50% da produção de soja em 2020/2021 (CONAB, 2022). O tamanho das regiões geográficas em que a soja é produzida no Brasil coloca o País em uma situação única no que diz respeito ao manejo de pragas, principalmente considerando a possibilidade de semear soja o ano todo em regiões tropicais, sem interrupção do inverno rigoroso, como ocorre nas regiões temperadas. O intensivo uso da terra, a ausência de rotação de culturas e de inverno rigoroso e o aumento do uso de agrotóxicos para o controle de pragas tem ameaçado a sustentabilidade da cultura da soja (GAZZONI, 2013; LISZBINSKI et al., 2020).

Uma doença que representou um marco na intensificação do uso de agrotóxico na cultura da soja no Brasil foi a ferrugem-asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., reportado em 2001 no Paraguai e no Brasil (YORINORI et al., 2001). A chegada e a disseminação do fungo *P. pachyrhizi* também apresentou impacto no uso de inseticidas na cultura uma vez que os

fungicidas mais eficientes no manejo da doença apresentam efeitos prejudiciais em fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium rileyi* e outros (SOSA-GÓMEZ et al., 2003). Além de fungos benéficos que podem ser afetados por fungicidas, predadores e parasitoides podem ser prejudicados nessas aplicações, contribuindo para o desequilíbrio biológico na cultura. Além disso, na tentativa de tornar as práticas de controle mais rápidas e simples, produtores de soja misturam inseticidas com fungicidas ou mesmo com herbicidas e aplicam mais cedo em uma única operação (SCHREINER et al., 2016). O uso indevido de agrotóxicos causa diversos problemas como intoxicação de aplicadores, produtores, contaminação no meio ambiente e morte de organismos não alvos (SHAHID; LIESS; KNILLMANN, 2017).

## 2.2 Uso de fungicidas e a seleção de resistência

O controle químico na cultura da soja foi intensificado com a entrada do fungo *P. pachyrhizi*. A ferrugem-asiática é considerada a doença mais severa da cultura, com danos variando de 10% a 90% nas diversas regiões geográficas onde foi relatada (YORINORI et al., 2005).

Em razão da dificuldade da detecção dos sintomas da ferrugem-asiática e das perdas ocasionadas nos primeiros anos, muitos produtores passaram a adotar aplicações calendarizadas, iniciando no pré-fechamento das linhas de semeadura (ao redor de 50 dias após a semeadura) e repetindo em intervalos de 14 dias. A calendarização faz com que a média de aplicações de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática e de outras doenças, em um ciclo da cultura no Brasil seja ao redor de 3,4 por hectare nas últimas safras (GODOY et al., 2020). Durante essas aplicações, todos os organismos que estão presentes na cultura (alvos e não alvos) são expostos.

O uso intensivo de fungicidas na cultura da soja tem levado a um aumento no relato no número de fungos resistentes a fungicidas (SCHMITZ et al., 2014; KLOSOWSKI et al., 2016; SIMÕES et al., 2018; MELLO et al., 2021). A resistência a fungicidas é uma característica hereditária, de ocorrência natural, levando indivíduos de uma população a sobreviver a um tratamento com um produto que normalmente daria controle eficiente (OEPP/EPPO, 1999).

Os casos de resistência a fungicidas no mundo permaneceram raros até a década de 1970, quando novas classes de produtos químicos antifúngicos com

modos de ação específicos foram introduzidos e se tornaram amplamente usados (BRENT, 2012). Desde então, a resistência se tornou frequente, sendo crescentes os relatos de redução da eficiência de fungicidas utilizados a campo (BRENT, 2012).

Fungicidas sítio-específicos interrompem processos celulares específicos e ligam-se a alvos proteicos específicos do patógeno. Dentre os principais modos de ação sítio-específicos, utilizados no controle de doenças na cultura da soja, destacam-se os fungicidas metil benzimidazol carbamato (MBC), os inibidores da desmetilação (IDM), os inibidores de quinona externa (IQe) e os inibidores da succinato desidrogenase (ISDH) (GODOY et al., 2020).

Fungicidas sítio-específicos são altamente ativos e muitas vezes têm ação sistêmica na planta, com bom controle em baixas doses. Após a aplicação do fungicida, a maioria dos indivíduos sensíveis da população de patógenos são removidos ou inibidos de completar seu ciclo de vida, resultando em uma forte seleção dos indivíduos resistentes (LUCAS; HAWKINS; FRAAIJE, 2014). A vulnerabilidade de fungicidas sítio-específicos ao desenvolvimento de resistência é uma consequência de diferentes fatores: o modo de ação do fungicida, a alta eficácia, a biologia dos patógenos e a epidemiologia.

O primeiro requisito para que ocorra resistência é haver variabilidade hereditária de sensibilidade ao fungicida na população dos patógenos (GEORGOPOULOS; SKYLAKAKIS, 1986). Os genomas fúngicos são muito plásticos e podem conter milhares de polimorfismos (CUOMO et al., 2007). Grandes populações de patógenos inevitavelmente conterão indivíduos raros, distintos, geneticamente estáveis, capazes de se opor em vários graus a qualquer impacto metabólico desfavorável e aumentar em resposta à seleção às custas de componentes sensíveis da população (HOLLIMON, 2015).

Na cultura da soja, um número crescente de relatos de fungos resistentes a fungicidas vem ocorrendo pelo excesso de utilização desses produtos, entre eles: *Cercospora* spp. resistente a MBC e IQe (MELLO et al., 2021), *Corynespora cassiicola* resistentes a MBC, IQe e ISDH (XAVIER et al., 2013; TERAMOTO et al., 2017; FRAC, 2021) e *P. pachyrhizi* menos sensível a IDM, IQe e ISDH (SCHMITZ et al., 2014; KLOSOWSKI et al., 2016; SIMÕES et al., 2018).

Se por um lado a evolução para seleção de resistência aos fungicidas sítio-específicos tem comprometido o controle de doenças em diferentes patossistemas (LUCAS; HAWKINS; FRAAIJE, 2014), essa mesma seleção pode ser

utilizada na busca de entomopatógenos adaptados que possam ser utilizados no controle biológico de pragas.

No Brasil existem 22 espécies de fungos, bactérias e vírus registrados para o controle de insetos-pragas, que estão inseridos na classe inseticida microbiológico pelo Mapa (Ministério da Agricultura e Pecuária) (AGROFIT, 2021). Dentre esses microrganismos, os fungos se destacam no manejo integrado de pragas por possuírem grande diversidade em número de espécies, linhagens e hospedeiros (CARRUTHERS; SAWYER; HURAL, 1991).

A utilização de fungos entomopatogênicos traz diversas vantagens ao produtor, como ser inofensivos para insetos benéficos, ter baixo impacto na biodiversidade natural do ecossistema, não deixar resíduos tóxicos e normalmente são específicos a artrópodes, não afetando plantas e mamíferos (SKINNER; BRUCE; KIM, 2014).

Os habitats para fungos entomopatogênicos são frequentemente caracterizados por condições físicas altamente desfavoráveis, como a exposição direta à radiação ultra violeta e temperaturas desfavoráveis. A radiação ultravioleta pode matar, inativar e atrasar a germinação de conídios. Baixa umidade também pode limitar a eficácia (VAN DEN BOSCH, 1971; ACHEAMPONG et al., 2020). Fungos entomopatogênicos toleram uma ampla variação de temperatura, porém, as temperaturas ideais para germinação, crescimento e esporulação são geralmente de 20°C a 30°C (GOETTEL; INGLIS; WRAIGHT, 2000; RANGEL et al., 2004; SKINNER; BRUCE; KIM, 2014). Todos esses fatores contribuíram para o fraco histórico de estabelecimento de entomopatógenos.

Além dos fatores ambientais, o uso constante de agrotóxicos como inseticidas (HALL; DUNN, 1959, URS; GOVINDU; SHASTRY, 1967, OLMERT; KENNETH, 1974), herbicidas (KOS; A CELAR, 2012) e fungicidas (OLMERT; KENNETH, 1974; SOPER; HOLBROOK; GORDON, 1974) possuem atividade fúngica afetando o crescimento e a esporulação do fungo, suprimindo populações de entomopatógenos que controlam naturalmente populações de insetos-pragas.

### 2.3. *Metarhizium rileyi* e importância para o controle biológico de pragas

*Metarhizium rileyi* foi descrito em 1883 originalmente como *Botrytis rileyi* (Farlow), passou por várias mudanças de nomenclatura como, *Nomuraea*

*prasina* (MAUBLANC, 1903), *Spicaria prasina*, *Spicaria rileyi* (CHARLES, 1936), *Beauveria rileyi* (GÖSSWALD, 1938) e *Nomuraea rileyi* (KISH; SAMSON; ALLEN, 1974). Por último, utilizando técnicas moleculares foi reclassificado para o gênero *Metarhizium* (KEPLER et al., 2014).

O fungo é conhecido como um entomopatógeno que se desenvolve em uma variedade de hospedeiros obrigatórios, particularmente os Noctuidae. Na cultura da soja destaca-se a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae), por sua abundância e ocorrência frequente em todas as regiões do País onde a soja é cultivada, estimando perdas de até 100% quando em altas populações e sem o manejo adequado. Alguns outros noctuídeos, como a lagarta-falsa-medideira, *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) e algumas espécies de *Spodoptera* têm também se destacado como desfolhadores importantes da cultura (MOSCARDI et al., 2013). O fungo também consegue afetar as espécies de *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Nocuidae), *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Nocuidae), *Pseudaletia sequax* Franclemont (Lepidoptera: Nocuidae), *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Nocuidae), como também *Spilosoma virginica* (Lepidoptera: Arctiidae) e *Chlosyne lacinia saundersii* Doubleday & Hewitson (Nymphalidae) (SOSA-GÓMEZ; LASTRA; HUMBER, 2010).

*Metarhizium rileyi* é um fungo dimórfico com hifas semelhantes a leveduras e fase de crescimento filamentosos, com uma grande diversidade de isolados, coletados em várias partes do mundo (HUMBER; HANSEN; WHELLER, 2011). Populações do entomopatógeno apresentam grande variabilidade genética em função dos processos de recombinação, da espécie hospedeira e da localização geográfica de coleta (SUWANNAKUT; BOUCIAS; WIWAT, 2005; DEVI et al., 2007).

A produção de um produto comercial se busca especificidade, produção em meio de cultura, resistência no ambiente em que é usado e alta patogenicidade do isolado. Esta última característica pode ser avaliada pela porcentagem de mortalidade em bioensaios, quantidade de hospedeiros infectados e tempo necessário para a germinação dos esporos (IGNOFFO et al., 1976, TIGANO-MILANI et al., 1995).

No entanto, a penetração rápida e direta na cutícula é importante para a virulência (PEKRUL; GRULA, 1979). Os conídios da maioria dos fungos entomopatogênicos aderem fortemente às cutículas dos insetos, envolvendo

mecanismos de adesão não específicos mediados pela hidrofobicidade da parede celular dos conídios (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988; BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1991).

Uma vez que um conídio entra em contato com uma cutícula de inseto apropriada, ele pode germinar e produzir tubo germinativo, a partir do qual a hifa de penetração é formada. Mesmo que a germinação ocorra, o fungo pode não ser capaz de penetrar na cutícula, devido a uma série de fatores, como um ambiente inadequado ou a presença de fatores inibidores como ácidos graxos ou melanina, na composição da cutícula. Para penetrar na cutícula, os fungos entomopatogênicos utilizam uma combinação de mecanismos enzimáticos e mecânicos (INGLIS et al., 2001).

*Metarhizium rileyi* produz proteases extracelulares, quitinases e lipases responsáveis pelas enzimas de penetração das hifas (MOHAMED; BELL; SIKOROWSKI, 1978). Uma vez que o fungo atinge a hemocele, ele cresce como corpos hifais, que são estruturas simples ou multicelulares que não possuem uma parede celular formal, mas contêm uma camada fibrilar fina na membrana plasmática (INGLIS et al., 2001).

Após a morte da lagarta, o fungo frequentemente cresce dentro do hospedeiro e metabólitos produzidos podem estar envolvidos na exclusão competitiva de microrganismos competidores do cadáver. Logo após a morte do hospedeiro, e em condições favoráveis, hifas emergem do cadáver e são produzidas células conidiogênicas, ocorrendo esporulação na superfície do hospedeiro onde são liberados os conídios (INGLIS et al., 2001).

Os esporos liberados infectam populações de insetos no campo e causam epizootias, tornando-se importantes na regulação natural de insetos-praga. Uma epizootia é o resultado de uma interação complexa entre o hospedeiro, o patógeno e o ambiente ao longo do tempo (BUTT; JACKSON; MAGAN, 2001). Porém, epizootias de *M. rileyi* podem ser atrasadas de 2 a 14 dias, no controle de populações de *A. gemmatilis*, pela utilização de fungicidas, favorecendo o aumento da população da praga no campo (SOSA-GÓMEZ et al., 2003).

Segundo Sosa-Gómez et al. (2003) os fungicidas benomil, difenoconazol, enxofre e carbendazim reduziram a germinação conidial do fungo, entretanto, carbendazim foi menos deletério em comparação com os outros fungicidas. Pessoa et al. (2021) analisaram os fungicidas epoxiconazol, tetraconazol,

trifloxistrobina + tebuconazol, azoxistrobina + ciproconazol e picoxistrobina + ciproconazol, e concluíram que todos os fungicidas afetaram o desenvolvimento do fungo, reduzindo o crescimento vegetativo e a esporulação. Matcha et al. (2021) verificaram 100% de inibição do crescimento micelial do fungo pelos fungicidas carbendazim e propiconazol, 36,7% pela azoxistrobina, 35% pelo tebuconazol e 12,5% pelo oxicloreto de cobre. Esses fungicidas diminuíram também a esporulação do fungo.

## 2.4. Seleção para isolados resistentes

O desenvolvimento de resistência a fungicidas é um processo evolutivo populacional e o seu monitoramento é crucial para entender quais mudanças a população pode estar sofrendo (FRAC, 2023). A natureza do fungicida e a genética da resistência influenciam a taxa e o padrão da emergência da resistência.

Fungicidas sítio-específicos, possuem uma única mutação na proteína alvo que pode conferir um alto nível de resistência, uma mudança qualitativa pode ocorrer, resultando em duas populações distintas com uma distribuição de sensibilidade bimodal, como é o caso de fungicidas MBC e IQe para a mutação G143A (LUCAS; HAWKINS; FRAAIJE, 2015). Com fungicidas multissítios ou alguns sítio-específicos como os IDM, onde mais de um gene ou alelo contribui para a resistência, uma distribuição unimodal é observada. Em ambos os casos, há seleção direcional para menor sensibilidade (LUCAS; HAWKINS; FRAAIJE, 2015).

Desta forma, a escolha do método para monitoramento ou seleção de resistência deve levar em conta não somente as características do fungo, mas também a natureza do fungicida.

No caso de avaliar resistência quantitativa, na qual ocorre distribuição unimodal ou menor sensibilidade, é utilizada a concentração efetiva para inibir 50% do crescimento ou germinação (CE50), aquela que inibe metade da amostra testada. A CE50 é estimada no ajuste da curva resposta do patógeno a uma série de concentrações (BROWN, 2006).

Na resistência qualitativa ocorre seleção disruptiva, a população de fungos pode ser dividida em duas distribuições discretas, em que uma é considerada sensível e outra resistente. A avaliação pode ser feita por dose discriminatória que consiste em uma taxa de dose única que é possível discriminar o isolado sensível ou

resistente (RUSSELL, 2002).

Além da definição das características do tipo da resistência (qualitativa ou quantitativa), as características do patógeno têm que ser avaliadas na escolha do método utilizado (CE50 ou dose discriminatória).

Um método comumente usado para medir a CE50 em fungos parasitas não obrigatórios, que crescem em meio de cultura, é por meio da redução do diâmetro da colônia do fungo em meio com fungicida (DEKKER, 1987; DEKKER; GEORGOPOULOS, 1982). No entanto, o método de inibição de crescimento micelial requer grande quantidade de meio de cultura, espaço e é demorado, e apenas o crescimento linear é medido e a densidade da colônia não é considerada (DEKKER, 1987). Também são mais utilizados em fungos que apresentam rápido crescimento de colônia. Outra técnica disponível avalia a redução do peso seco de micélio produzido em meio líquido, mas esse método requer ainda mais espaço, tempo e material (DEKKER; GEORGOPOULOS, 1982).

Métodos utilizando microtitulação colorimétrica também tem sido bastante utilizado para monitoramento de resistência para vários patógenos (STAMMLER; BENZINGER; SPEAKMAN, 2007; VEGA et al., 2012). Esses métodos necessitam que os fungos apresentem abundantemente esporulação para padronização do inóculo a ser utilizado na avaliação.

Um teste rápido e simples baseado na germinação de conídios de *Botrytis* em meio acrescido de vários fungicidas foi utilizado para determinar a CE50, avaliando-se a redução do crescimento do tubo germinativo em meio com 1% de ágar com extrato de malte com diferentes fungicidas. A fim de detectar diferentes níveis de resistência, duas concentrações discriminatórias foram identificadas para cada composto. Nesse método de ensaio de rotina, gotas de uma suspensão de conídios colhidos diretamente de material vegetal doente ou culturas esporuladas eram incubadas em cada um dos 20 diferentes meios com fungicidas e avaliados após 24-48 horas (WEBER; HAHN, 2011). O teste utilizando germinação de esporos apresenta a vantagem de ocupar pouco espaço e apresentar respostas rápidas, necessitando apenas que o fungo apresente boa esporulação. Esse método é o mais recomendado para os fungicidas como os dos grupos ISDH e IQe que inibem a germinação de esporos.

## 2.5. Mecanismo de resistência dos fungicidas da classe MBC

Os fungicidas do grupo químico metil-2-benzimidazole carbamato (MBC), bloqueiam a divisão celular, impedindo a polimerização das subunidades de  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina (KUS; ALTANLAR, 2003) e pertencem a três classes: benzimidazóis, N-fenilcarbamatos e benzamidas. Os fungicidas com tiofanato são geralmente considerados pertencentes à classe dos benzimidazóis, uma vez que são profungicidas que são convertidos em carbendazim (YOUNG, 2015).

Este grupo químico foi a primeira classe química de fungicida com um único sítio de ação, controlando um amplo espectro de patógenos dos Filos Ascomycota e alguns Basidiomycota, que pertencem ao Reino Fungi, não tendo efeito sobre organismo do filo Oomycota, que pertencem ao Reino Chromista.

A resistência a esse grupo de fungicida é qualitativa, onde o patógeno é considerado sensível ou resistente (MCGRATH, 2001). Mutações na proteína  $\beta$ -tubulina conferem resistência aos benzimidazóis. Mutações nos codons 6, 50, 167, 198, 200 e 240 foram identificadas em laboratório e podem ser encontradas em cepas resistentes a campo, porém, as substituições de ácido glutâmico na posição 198 por um aminoácido alanina (E198A) ou glicina (E198G) ou lisina (E198K) ou glutamina (E198Q) e a substituição da fenilalanina na posição 200 por um aminoácido tirosina (F200Y) são as mais prevalentes (KOENRAADT; JONES, 1992; MA; MICHAILIDES, 2005).

## 2.6. Mecanismo de resistência dos fungicidas da classe IQe

Os fungicidas inibidores da respiração do complexo III são muito utilizados no controle de doenças, representado pelo seu maior grupo IQe. Seu sucesso no mercado está baseado nos efeitos benéficos na fisiologia vegetal e no amplo espectro de atividades nas maioria dos Ascomycetes, Basidiomycetes e Oomycetes (BARTLETT et al., 2002). Porém, os fungicidas podem variar em atividade contra as diferentes doenças de plantas, com isso nem sempre se obtém altos níveis de controle, como o ingrediente ativo metominostrobin que possui eficiência moderada no controle de oomicetos (BARTLETT et al., 2002).

O mecanismo primário de resistência a IQe é baseado no local alvo e envolve mutações no gene mitocondrial do citocromo *b* (*cyt b*). O citocromo *b* faz parte do complexo citocromo bc1, localizado na membrana mitocondrial interna de

fungos e outros eucariotos (BARTLETT et al., 2002). A rota de ação dos IQe nos fungos é bloquear a cadeia de transferência de elétrons no complexo bc1 da cadeia respiratória, impedindo a transferência de elétrons no sítio da mitocôndria, portanto, pode causar perdas na síntese de ATP e inibição da respiração celular (BARTLETT et al., 2002; SIEROTZIKI, 2015).

A resistência a IQe é baseada em mutações de ponto, sendo a substituição da glicina na posição 143 por um aminoácido alanina no gene *cyt b* (G143A) a principal, que confere resistência completa ao fungicida (GISI et al., 2000). Outras mutações também descritas para os fungicidas IQe são a substituição da fenilalanina na posição 129 por um aminoácido leucina (F129L) e a substituição da glicina na posição 137 por um aminoácido arginina (G137R), ambas no gene *cyt b*, associados a resistência moderada (parcial) ao fungicida.

## 2.7. Mecanismo de resistência dos fungicidas da classe IDM

Os fungicidas inibidores de desmetilação de esteróis (IDM) são um importante grupo de fungicidas no manejo dos fungos da classe Ascomycetos e Basidiomycetos (SILVA JUNIOR; BEHLAU, 2018).

Os fungicidas IDMs atuam na enzima 14 $\alpha$ -demetilase, a qual é codificada pelo gene *cyp51*, membro da família do citocromo P450. A rota de ação do grupo químico consiste em afetar a integridade da membrana celular do fungo, inibindo a formação de esterol. Os esteróis são constituintes essenciais das membranas celulares dos fungos que regulam a estabilidade e a permeabilidade, sendo muito importantes para o seu crescimento (ZIOGAS; MALANDRAKIS, 2015).

O mecanismo de resistência para IDMs é poligênico, podendo agir individualmente ou em combinação. Cada mutação individual normalmente causa apenas pequena redução na sensibilidade. Somente após o acúmulo de múltiplas mutações, em um isolado, ocorre redução suficiente na sensibilidade para impactar a eficiência do fungicida em condições de campo (FRAC, 2020). Ao longo dos anos foram identificados, em populações de patógenos diferentes mecanismos associados à diminuição da sensibilidade a esses compostos, incluindo modificação do local-alvo, superexpressão do gene *cyp51*, aumento do efluxo e várias cópias do gene alvo (ZIOGAS; MALANDRAKIS, 2015).

### 3. ARTIGO A: Sensibilidade de isolados do fungo entomopatogênico de lagartas *Metarhizium rileyi* a fungicidas

#### 3.1 Resumo

Aplicações de fungicidas foliares atingem não somente os organismos alvos mas também os que não são alvos, como entomopatógenos que suprimem naturalmente populações de inseto-praga. Como muitos fungicidas são potencialmente prejudiciais a fungos entomopatogênicos, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de fungicidas em *Metarhizium rileyi*, fungo entomopatogênico de lagartas, buscando encontrar populações menos sensíveis que possam ser utilizadas no controle biológico. Foi avaliada a sensibilidade do fungo a fungicidas dos grupos: metil benzimidazol carbamatos (MBC), inibidores da desmetilação (IDM) e inibidores da quinona externa (IQe) por meio da germinação de esporos. Foram avaliados 39 isolados de *M. rileyi*, depositados na Coleção Micológica da Embrapa Soja. O fungicida carbendazim (MBC) foi avaliado por meio de dose discriminatória na concentração de 1 ppm. Picoxistrobina e azoxistrobina (IQe) foram avaliados nas doses de 0,01; 0,1 e 1 ppm. Os fungicidas tebuconazol e protioconazol (IDM) foram avaliados nas concentrações de 0; 0,1; 1; 2; 5 e 10 ppm para determinação da concentração efetiva para reduzir 50% da germinação (CE50). Trinta e cinco isolados foram considerados resistentes ao ingrediente ativo carbendazim e todos os isolados foram considerados sensíveis à picoxistrobina e à azoxistrobina. Para protioconazol e tebuconazol as CE50 médias foram 0,34 e 0,77 ppm, respectivamente. Somente um isolado (Nr 424, 2003) apresentou CE50  $\geq$  1 ppm para o ingrediente ativo protioconazol e 18 isolados para tebuconazol, sendo cinco obtidos antes de 1996, ano que se recomendou as primeiras aplicações do grupo químico para a cultura da soja, e 13 a partir de 1996. Um único isolado apresentou CE50 superior a 2 ppm para tebuconazol (Nr 152, 1996).

**Palavras-chave:** Controle biológico. Inibidores da desmetilação. Inibidores da quinona externa. Metil benzimidazol carbamatos.

### 3.2 Abstract

Foliar fungicide applications reach not only target organisms but also non-target organisms, such as entomopathogens that naturally suppress insect pest populations. As many fungicides are potentially harmful to entomopathogenic fungi, this work aimed to evaluate the effect of fungicides on *Metarhizium rileyi*, an entomopathogenic fungus of caterpillars, aiming to find less sensitive populations that can be used in biological control. The sensitivity of the fungus to fungicides from the following groups: methyl benzimidazole carbamates (MBC), demethylation inhibitors (DMI) and external quinone inhibitors (QoI) was evaluated through spore germination. We evaluated 39 *M. rileyi* isolates from the Embrapa Soja Mycological Collection. The fungicide carbendazim (MBC) was evaluated using a discriminatory dose at a concentration of 1 ppm. Picoxystrobin and azoxystrobin (QoI) were evaluated at doses of 0.01, 0.1, and 1 ppm. Tebuconazole and prothioconazole (DMI) were assessed at 0, 0.1, 1, 2, 5, and 10 ppm to determine the effective concentration to reduce the spore germination in 50% (CE50). Thirty-five isolates were resistant to carbendazim. All isolates were sensitive to picoxystrobin and azoxystrobin. For prothioconazole and tebuconazole the mean EC50 were 0.34 and 0.77 ppm, respectively. Only one isolate (Nr 424, 2003) presented EC50  $\geq$ 1 ppm for the active ingredient prothioconazole and 18 isolates for tebuconazole, five of which were obtained before 1996, the year in which the first applications of the chemical group for soybean cultivation were recommended, and 13 from 1996. A single isolate showed an EC50 greater than 2 ppm for tebuconazole (Nr 152, 1996).

**Key words:** Biological control. Demethylation Inhibitors. Quinone outside inhibitors. Methyl benzimidazole carbamate.

### 3.3 Introdução

Fungos entomopatogênicos desempenham papel importante na regulação natural de insetos-praga em diversas culturas, consistindo em um dos pilares do manejo integrado de pragas. A sobrevivência de entomopatógenos em agroecossistemas depende de muitos fatores bióticos e abióticos como temperatura, luz solar, umidade, predadores, hiperparasitas e a presença de agrotóxicos (BUTT; JACKSON; MAGAN, 2001).

Na cultura da soja, o aumento na frequência de aplicações de fungicidas foi observada a partir de 2001 com a chegada do fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., causador da ferrugem-asiática, no Paraguai e no Brasil, considerada a principal doença da cultura (YORINORI et al., 2001). Aplicações sucessivas de fungicidas são feitas para manejar a ferrugem-asiática e outras doenças, porém, todos os organismos presentes na cultura, alvos e não alvos, são expostos a essas aplicações. Os fungicidas apresentam efeito prejudicial em fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium rileyi* e outros, podendo afetar o desenvolvimento de epizootias e favorecer o aumento do número de lagartas (SOSA-GÓMEZ et al., 2003).

Os principais grupos químicos de fungicidas utilizados na cultura da soja são metil benzimidazol carbamatos (MBC), inibidores da quinona externa (IQe) e inibidores da desmetilação (IDM). Os fungicidas do grupo químico MBC bloqueiam a divisão celular, impedindo a polimerização das subunidades de  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina (KUS; ALTANLAR, 2003). Esse modo de ação é altamente específico e pode ser superado por mutações pontuais (MCGRATH, 2001). Conseqüentemente, esses fungicidas são considerados de alto risco para o desenvolvimento de resistência (FRAC, 2022b).

Os fungicidas do grupo químico IQe bloqueiam a cadeia de transferência de elétrons no complexo bc1 da cadeia respiratória, impedindo a transferência de elétrons no sítio da mitocôndria, causando perdas na síntese de ATP, inibindo a respiração celular (BARTLETT et al., 2002, SIEROTZIKI, 2015). Assim como os MBC, os IQe são fungicidas com modo de ação específico, podendo ser superados por mutações pontuais (GISI et al., 2000), sendo classificados como fungicidas de alto risco para desenvolvimento de resistência (FRAC, 2022a).

Os fungicidas do grupo químico IDM afetam a integridade da

membrana celular do fungo, inibindo a formação de esterol. Os esteróis são constituintes essenciais das membranas celulares dos fungos que regulam a estabilidade e a permeabilidade, sendo muito importante para o seu crescimento (ZIOGAS; MALANDRAKIS, 2015). Apesar de apresentarem modo de ação específico, a menor sensibilidade é conferida pelo acúmulo de diferentes mutações pontuais (BRENT; HOLLOWOMON, 2007). Esses fungicidas são considerados de médio risco para o desenvolvimento de resistência (BRENT; HOLLOWOMON, 2007).

A seleção ou obtenção de fungos entomopatogênicos menos sensíveis ou resistentes a fungicidas pode ser benéfica por poder apresentar vantagem adaptativa ao serem utilizados no controle biológico, pela maior produção e germinação de esporos, como crescimento micelial em comparação com isolados sensíveis (LOPES et al., 2021; MATCHA et al., 2021). A implementação bem sucedida de fungos entomopatogênicos no manejo de insetos dependerá de sua compatibilidade com outras medidas de manejo fitossanitários (URS; GOVINDU; SHASTRY, 1967; SOPER; HOLBROOK; GORDON, 1974; KOS; A CELAR, 2012).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade de isolados de *M. rileyi* a fungicidas dos grupos químicos MBC, IDM e IQe, buscando isolados adaptados dentro da Coleção Micológica da Embrapa Soja e Embrapa Cenargen.

### 3.4 Material e Métodos

#### 3.4.1 Amostras e manutenção dos isolados de *Metarhizium rileyi*

Foram utilizados 39 isolados do fungo entomopatogênico *M. rileyi*, sendo 31 pertencentes a Coleção Micológica da Embrapa Soja (Nr) e 8 da Coleção Micológica da Embrapa Cenargen (CG). Os 39 isolados foram coletados entre os anos de 1983 a 2021, sendo um isolado dos Estados Unidos, dois isolados da Argentina e 36 isolados do Brasil (Tabela 1). Os 36 isolados do Brasil foram coletados nos estados de São Paulo (SP) (n=1), de Goiás (GO) (n=1), de Mato Grosso (MT) (n=5), da Bahia (BA) (n=1), de Rondônia (RO) (n=3), de Minas Gerais (MG) (n=2), do Distrito Federal (DF) (n=5) e do Paraná (PR) (n=18). Dos 18 isolados coletados no Paraná, foram coletados nos municípios de: Sertanópolis (n=1), Ponta Grossa (n=1) e Londrina, no Distrito de Warta (n=16)(41% dos isolados avaliados). Os isolados foram obtidos a partir de espécies parasitadas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner)(Lepidoptera: Erebididae), *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae), *Chrysodeixis includens* (Walker)(Lepidoptera: Noctuidae), *Rachiplusia nu*

(Guenée) (Lepidoptera: Nocuidae) e *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae) parasitadas (Tabela 1).

**Tabela 1** Identificação, município, estado, País, ano e espécie dos insetos onde foi feita a coleta dos isolados de *Metarhizium rileyi*.

Identificação	Município	Estado, País	Ano	Espécie
Nr 10	Assis	São Paulo, BR	1990	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 27	Londrina	Paraná, BR	1990	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 32	Ponta Grossa	Paraná, BR	1990	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 66	Londrina	Paraná, BR	1992	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 135	Londrina	Paraná, BR	1998	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 141	Quincy	Florida, EUA	1993	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 148	Goiânia	Goiás, BR	1983	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Nr 149	Oliveiros	Santa Fé, AR	1998	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Nr 152	Brasília	Distrito Federal, BR	1996	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 174	Londrina	Paraná, BR	1999	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 250	Londrina	Paraná, BR	1999	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Nr 254	Londrina	Paraná, BR	1999	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 304	Planaltina	Distrito Federal, BR	1999	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 378	Londrina	Paraná, BR	2001	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 424	Campo Novo do Parecis	Mato Grosso, BR	2003	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 449	Campo Novo do Parecis	Mato Grosso, BR	2003	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 455	Londrina	Paraná, BR	2003	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 489	Chivilcoy	Buenos Aires, AR	2001	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 494	Vilhena	Rondônia, BR	2006	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Nr 495	Vilhena	Rondônia, BR	2006	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Nr 553	Gonçalves	Minas Gerais, BR	2007	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 557	Sertanópolis	Paraná, BR	2008	<i>Pseudoplusia sp.</i>
Nr 600	Londrina	Paraná, BR	2018	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 601	Londrina	Paraná, BR	2018	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 604	Vilhena	Rondônia, BR	2018	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 605	Londrina	Paraná, BR	2018	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 606	Londrina	Paraná, BR	2018	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 607	Londrina	Paraná, BR	2018	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 608	Londrina	Paraná, BR	2018	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Nr 611	Londrina	Paraná, BR	2021	<i>Rachiplusia nu</i>
Nr 612	Londrina	Paraná, BR	2021	<i>Rachiplusia nu</i>
CG 1247	-	Bahia, BR	2013	<i>Helicoverpa armigera</i>
CG 1250	Primavera do Leste	Mato Grosso, BR	2013	<i>Chrysodeixis sp.</i>
CG 1251	Pedra Preta	Mato Grosso, BR	2013	<i>Helicoverpa armigera</i>
CG 1252	Pedra Preta	Mato Grosso, BR	2013	<i>Helicoverpa armigera</i>
CG 1416	-	Distrito Federal, BR	2019	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
CG 1417	-	Distrito Federal, BR	2019	<i>Spodoptera frugiperda</i>
CG 1435	Buritit	Minas Gerais, BR	2020	-
CG 1457	Planaltina	Distrito Federal, BR	2021	<i>Spodoptera frugiperda</i>

BR – Brasil; AR – Argentina; EUA - Estados Unidos da América.

### 3.4.2 Inibição do crescimento micelial de *Metarhizium rileyi* in vitro

O meio utilizado para multiplicação de *M. rileyi* foi o meio de ágar Sabouraud Maltose fortificado com extrato de levedura 1% (SMAY) (10g de neopeptona, 40g de maltose, 10g de extrato de levedura, 15g ágar e 1L de água). Os isolados foram cultivados em meio de cultura SMAY em placas de 5 cm de diâmetro, e mantidos em BOD na temperatura de 26 °C e fotoperíodo de 12h, durante 5 a 20 dias, dependendo do isolado.

A germinação de esporos de *M. rileyi* foi avaliada em lâminas de vidro usadas em microscopia com meio SMAY acrescido de fungicidas dos grupos MBC (carbendazim), IQe (picoxistrobina e azoxistrobina) e IDM (protioconazole e tebuconazole), em diferentes concentrações. Os fungicidas foram adicionados ao meio SMAY, seguindo as concentrações de cada tratamento, com a temperatura aproximada de 40 °C, evitando a degradação do fungicida. Com o meio ainda não solidificado, foi vertido 1 mL da mistura nas lâminas com auxílio de pipeta.

Obteve-se a suspensão de conídios por meio da adição de 5 mL de água destilada esterilizada, seguido de raspagem das colônias nas placas. Foi feito a filtragem do micélio e dos conídios com uma camada dupla de gaze esterilizada. A concentração foi ajustada para  $2 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> com auxílio de câmara de Neubauer. A distribuição dos conídios do fungo nas lâminas foi feita após a solidificação do meio, por meio de aspersão utilizando um nebulizador.

A germinação de esporos foi avaliada dois dias após a incubação em BOD à 26 °C  $\pm$  2 °C e fotoperíodo de 12/12 horas, por meio da contagem de esporos. Foram considerados conídios germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo com comprimento de, no mínimo, uma vez o tamanho do conídio. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 5 repetições, sendo cada repetição constituído por uma lâmina onde foram realizadas duas contagens de 100 conídios, totalizando 200 conídios por repetição.

Os fungicidas dos grupos MBC: carbendazim (500 g L<sup>-1</sup>, Carbendazim Nortox®, Nortox Ltda.) e IQe: azoxistrobina (250 g L<sup>-1</sup>, Priori®, Syngenta Crop Protection Ltda.) e picoxistrobina (250 g L<sup>-1</sup>, Oranis®, DuPont S.A.) foram trabalhados com doses discriminatórias, pela resistência mais comum a esses grupos de fungicidas ser descrita como qualitativa (LUCAS; HAWKINS; FRAAIJE, 2014). A dose discriminatória é uma dose única na qual, dependendo da reação do

isolado, é possível classificar o isolado como sensível ou resistente. Um isolado resistente é definido como aquele com crescimento de 50% ou mais na presença do fungicida (RUSSELL, 2002).

Inicialmente foram feitas análises preliminares com oito isolados escolhidos aleatoriamente para ambos grupos químicos, nas doses de 0, 1, 10 e 50 ppm. O experimento foi repetido duas vezes. Nestes experimentos preliminares, para o fungicida carbedazim, a germinação de conídios de *M. rileyi* nas doses de 1, 10 e 50 ppm não diferiram estatisticamente, sendo escolhida a concentração de 1 ppm para trabalhar como dose discriminatória. Os isolados foram considerados resistentes quando tiveram germinação acima de 50% na presença do fungicida. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes.

Durante as análises preliminares para o grupo químico IQe, as doses de 1, 10 e 50 ppm inibiu 100% da germinação de esporos, sendo avaliada também as doses de 0,1 e 0,01 ppm. Durante as análises, os fungicidas do grupo químico IQe foram misturados com ácido salicilhidroxâmico (SHAM), um inibidor da oxidase alternativa insensível ao cianeto (AOX). No entanto, observou-se que o SHAM reduziu significativamente a CE50 ao grupo químico IQe, como observado por Liang et al. (2019) para os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*. Dessa forma, o grupo químico IQe foi avaliado sem SHAM. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes.

Os ingredientes ativos do grupo dos IDM: protioconazol (250 g L<sup>-1</sup>, NFK 57®, Oxon Química) e tebuconazol (200 g L<sup>-1</sup>, Tebufort®, UPL S.A.) as concentrações finais do ingrediente ativo no meio foi 0; 0,1; 1; 2; 5 e 10 ppm. O experimento foi repetido duas vezes. A eficiência de controle foi calculada pela porcentagem de esporos germinados nas diferentes doses em relação a germinação no tratamento controle sem fungicida. Para a estimativa da concentração efetiva para reduzir 50% da germinação (CE50) os modelos log-logístico ou distribuição de Weibull foram ajustados aos dados com auxílio do pacote “drc” do software R (R CORE TEAM, 2021).

As comparações dos experimentos para os ingredientes ativos carbendazim, picoxistrobina e azoxistrobina foram realizadas pelo teste t com nível de significância  $p \leq 0,05$ . Posteriormente, os dados de germinação foram testados quanto à homogeneidade das variâncias entre os tratamentos usando o teste de Bartlett. A comparação da variância entre os 2 experimentos foi realizada pelo teste

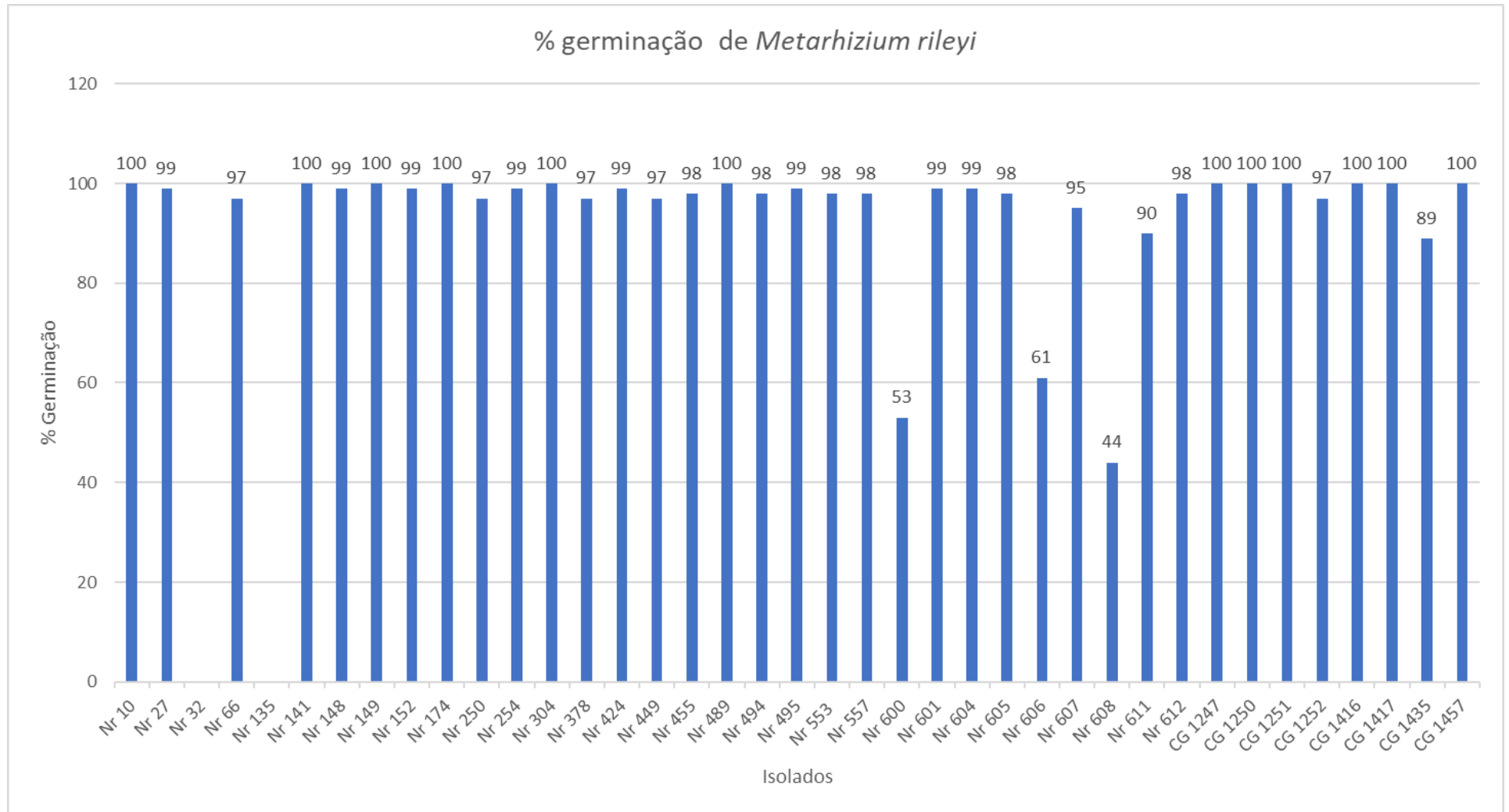
F ( $p < 0,05$ ), a análise de variância foi realizada pelo F-test para comparar a variância dos dois experimentos. Quando não significativas, foram feitas as médias das germinações nas duas doses. Estas análises foram realizadas com o auxílio do software R (R CORE TEAM, 2021).

### 3.5 Resultados e discussão

Independente do ano do isolamento, o ingrediente ativo carbendazim, na dose discriminatória de 1 ppm, 36 isolados do fungo *M. rileyi* foram considerados resistentes, com porcentagem de germinação variando entre 53% a 100% (Figura 1). Os experimentos com os isolados Nr 32 e Nr 135 foram perdidos por não germinarem e o isolado Nr 608 foi considerado sensível (44% de germinação). Sosa-Gómez et al. (2003) trabalhando com os mesmos isolados (Nr 250, Nr 304 e Nr 424) encontraram que o carbendazim foi um dos fungicidas menos nocivos em comparação com difenoconazol, enxofre e benomil.

As primeiras recomendações de utilização de fungicidas para controle de doenças na cultura da soja iniciaram em 1996/1997, para o controle do oídio (REIS; MEDEIROS; CASA, 1997) e mesmo os isolados de *M. rileyi* coletados anteriormente a 1996 (Nr 10, Nr 27, Nr 66, Nr 148 e Nr 152) apresentaram germinação  $\geq 97\%$ , mostrando insensibilidade do fungo a carbendazim. Os isolados coletados nos EUA (Nr 141) e na Argentina (Nr 149 e Nr 489) também foram resistentes a carbendazim, com germinação de 100% a 1 ppm (Figura 1).

Uma das hipóteses da resistência de 36 dos 37 isolados avaliados ao carbendazim, incluindo os isolados coletados anteriormente à recomendação de fungicidas na cultura da soja, é que a insensibilidade a carbendazim seja uma característica inerente do fungo *M. rileyi*. Patógenos de plantas podem ser considerados naturalmente resistentes quando não são afetados por um grupo de fungicidas (BRENT; HOLLOWAY, 2007). Por exemplo, os ingredientes ativos metalaxil, benomil e iprodione apresentam baixa atividade em fungos que causam as ferrugens (HEWITT, 1998).



**Figura 1** Porcentagem de germinação de populações de *Metarhizium rileyi* ao ingrediente ativo carbendazim na concentração de 1ppm.

No entanto, Matcha et al. (2021) avaliando a sensibilidade de um único isolado a carbendazim e outros diferentes produtos químicos em meio de cultura, encontrando 100% de inibição no crescimento micelial e ausência de germinação para a dose de 1 g L<sup>-1</sup> (1000 ppm) de carbendazim 50 WP. A baixa frequência de isolados sensíveis neste trabalho também pode ter ocorrido pela baixa variabilidade de locais de coleta, uma vez que 41% dos isolados avaliados foram coletados no distrito de Warta, no município de Londrina.

Para outras espécies de *Metarhizium*, Damin et al. (2011) observaram para dois isolados de *M. anisopliae* coletados na Austrália em 1979 e 1974, completa inibição de crescimento micelial com carbedazim na dose de 1,43 mL L<sup>-1</sup> (1430 ppm) que é a dose recomendada a campo. No caso do isolado da espécie *M. flavoviride* coletado na Alemanha em 1963, observaram germinação somente na dose de 0,170 µL L<sup>-1</sup> (0,170 ppm). Niassy et al. (2012), observaram completa inibição do crescimento micelial e da esporulação de um isolado *M. anisopliae* em 1/10 da dose de campo para o fungicida carbendazim. Esses trabalhos demonstram a existência de sensibilidade de outras espécies de *Metarhizium* ao carbendazim, em doses inferiores às utilizadas neste trabalho, precisando ser estudada a hipótese de que isolados de *M. rileyi* são menos sensíveis ao grupo químico em comparação com outras espécies.

Outra hipótese para o maior número de isolados resistentes neste trabalho é que o fungo possa ter sido selecionado por meio das aplicações de fungicidas no controle de lagartas em outras culturas. O grupo químico MBC foi introduzido no mercado no final dos anos 1960 (YOUNG, 2015) e é utilizado frequentemente, ano a ano, desde sua liberação até os dias atuais, podendo ter favorecido a seleção de *Metarhizium* que se disseminaram para a cultura da soja.

Fungicidas do grupo MBC são classificados como produtos de alto risco de resistência e mais de 100 espécies de fungos desenvolveram resistência ao grupo desde a sua liberação (BRENT; HOLLONDON, 2007; FRAC, 2022b), sendo observada resistência em menos de cinco anos após seu registro para *Cercospora beticola* (GEORGOPOULOS, 1982), *Didymella bryoniae* (MALATHRAKIS; VAKALOUNAKIS, 1983) e *Botrytis squamosa* (PRESLY; MAUDE, 1979). Dessa forma, os isolados de *M. rileyi* podem apresentar resistência adquirida pelo uso em outras culturas, uma vez que o isolado mais antigo (Nr 148, 1983) é posterior aos registros de fungicidas MBC no mundo.

A resistência ao grupo MBC é descrita como estável e, em muitos casos, uma vez selecionada, mutantes podem persistir na população por muitos anos, permanecendo em algumas áreas por 10 anos ou mais, mesmo depois que o uso dos fungicidas MBC é interrompido (FRAC, 2022b, WALKER et al., 2013), corroborando a permanência da resistência por aproximadamente 40 anos, desde 1983 até 2022.

A comprovação da resistência adquirida ou insensibilidade natural pode ser verificada pelo sequenciamento do gene da  $\beta$  tubulina do fungo, verificando a presença das principais mutações nos códons 6, 50, 167, 198, 200, e 240 que conferem resistência ao grupo MBC (MA; MICHAILEDIS, 2005).

Assim, 36 isolados foram considerados resistentes para carbendazim, atendendo ao objetivo do trabalho. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) decidiu pela suspensão cautelar do agrotóxico, suspendendo a importação, a produção, a distribuição e a comercialização dos produtos e uso de produtos à base do carbendazim no Brasil (ANVISA, 2022).

Na dose discriminatória de 1 ppm, para os ingredientes ativos picoxistrobina e azoxistrobina, não ocorreu a germinação dos esporos, sendo todos os isolados sensíveis a essa dose. Na concentração de 0,1 ppm, 13 isolados (34,2%) não germinaram para o grupo químico (Tabela 2). Na concentração de 0,01 ppm, 29 isolados (74,4%) e 19 isolados (48,7%) apresentam germinação  $\geq 70\%$  para picoxistrobina e azoxistrobina, respectivamente. Observa-se a alta sensibilidade de todos os isolados avaliados pelos baixos percentuais de germinação na concentração de 0,1 ppm (Tabela 2).

**Tabela 2** Germinação (%) de esporos de *Metarhizium rileyi* em lâminas com os ingredientes ativos picoxistrobina e azoxistrobina, nas concentrações de 1, 0,1 e 0,01 ppm.

Isolados	picoxistrobina			azoxistrobina		
	1 ppm	0,1 ppm	0,01 ppm	1 ppm	0,1 ppm	0,01 ppm
Nr 10	0	NA	NA	0	NA	NA
Nr 27	0	NA	NA	0	NA	NA
Nr 32	0	0	92	0	0	59
Nr 66	0	0	87	0	0	97
Nr 135	0	0	94	0	0	95
Nr 141	0	3	100	0	2	79
Nr 148	0	1	99	0	10	99

Nr 149	0	1	79	0	5	97
Nr 152	0	10	95	0	7	100
Nr 174	0	NA	NA	0	NA	NA
Nr 250	0	NA	NA	0	NA	NA
Nr 254	0	NA	NA	0	NA	NA
Nr 304	0	NA	NA	0	NA	NA
Nr 378	0	7	53	0	0	23
Nr 424	0	46	82	0	57	94
Nr 449	0	0	62	0	0	63
Nr 455	0	NA	NA	0	NA	NA
Nr 489	0	7	100	0	10	33
Nr 494	0	11	94	0	11	96
Nr 495	0	0	95	0	2	65
Nr 553	0	44	100	0	60	100
Nr 557	0	12	43	0	9	28
Nr 600	0	0	100	0	5	100
Nr 601	0	0	71	0	0	100
Nr 604	0	0	100	0	0	59
Nr 605	0	0	38	0	0	68
Nr 606	0	0	67	0	0	71
Nr 607	0	0	44	0	0	35
Nr 608	0	0	84	0	0	42
Nr 611	0	NA	NA	0	NA	NA
Nr 612	0	0	88	0	36	98
CG 1247	0	2	68	0	5	1
CG 1250	0	7	100	0	2	60
CG 1251	0	12	97	0	11	64
CG 1252	0	21	99	0	0	55
CG 1416	0	11	94	0	0	74
CG 1417	0	7	86	0	2	64
CG 1435	0	2	83	0	10	81
CG 1457	0	7	92	0	7	95

Não analisado (NA)

Matcha et al. (2021) analisaram um isolado de *M. rileyi* e obtiveram para o fungicida azoxistrobina, na dose de 1 ppm, inibição de 8,2% do crescimento do fungo e 38,9% da esporulação em comparação com a testemunha, diferente da germinação nula encontrada na mesma dose nesse trabalho. Para *M. anisopliae*, Silva et al. (2013) analisaram um isolado em Goiás do ano de 1985, nas dose de 3,125 ppm para o ingrediente ativo trifloxistrobina e 1,125 ppm para ingrediente ativo azoxistrobina, encontraram, respectivamente, compatibilidade e moderada toxicidade aos fungicidas.

As estrobilurinas foram descobertas por Anke (1995) em 1977, porém, a primeira introdução do produto no mercado foi apenas em 1996.

Fungicidas do grupo IQe são classificados como produtos de alto risco de resistência e desde sua liberação mais de 45 fungos desenvolveram resistência ao grupo (BRENT; HOLLOWON, 2007; FRAC, 2022a). Na cultura da soja, foi relatada resistência das espécies de *Cercospora kikuchii*, *Phakopsora pachyrhizi* e *Corynespora cassiicola* (PRICE et al., 2015; SCHMITZ et al., 2014, TERAMOTO et al., 2017).

No presente trabalho, a inibição total da germinação dos esporos na concentração de 1 ppm para todos os isolados de *M. rileyi* avaliados (Tabela 2), tanto nos isolados anteriores a 1996 quanto nos mais recentes, pode ter ocorrido pela baixa variabilidade dos locais de coleta e pelo baixo número de isolados avaliados.

Outro fator que pode ter afetado a ausência de isolados resistentes é a liberação comercial da tecnologia Bt. A abreviação Bt deriva do nome da bactéria entomopatogênica, *Bacillus thuringiensis* Berliner. Na cultura da soja a tecnologia foi liberada inicialmente em 2012, com a inserção as proteínas Cry1Ac e Cry1F na cultura da soja, derivadas da bactéria *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, que conferem à soja resistência aos principais insetos-praga da ordem Lepidoptera associados à cultura. A tecnologia, desde a sua liberação em 2005, teve um aumento gradual da sua taxa de adoção, motivado pelos benefícios no controle de pragas (BERNARDI et al., 2016). A diminuição de lepidópteros causada pela utilização da tecnologia afeta o número de hospedeiros disponíveis para o fungo *M. rileyi*, diminuindo a população do entomopatógeno por falta do seu hospedeiro. A diminuição da população do entomopatógeno reduz a pressão de seleção de populações por fungicidas, dificultando encontrar indivíduos que sobrevivam a doses maiores de fungicidas. Além do mais, a diminuição da população pode dificultar a amostragem de indivíduos infectados pelo fungo, tornando mais difícil encontrar isolados para serem analisados.

No entanto, atualmente com a baixa aderência de refúgio e o intenso uso da tecnologia, estão sendo relatadas ocorrência de lagartas em soja Bt, como *Spodoptera frugiperda* (BERNARDI et al., 2015), *Rachiplusia nu* e *Crociosema aporema* (BUENO; SOSA-GÓMEZ, 2021, HORIKOSHI, et al., 2021). A seleção de pragas resistentes a tecnologia Bt favoreceu a ocorrência de lagartas em soja, conseqüentemente, aumentando o número infecções causada pelo fungo e favorecendo a pressão de seleção de fungicida em populações de *M. rileyi*. O

constante monitoramento é importante para identificar isolados resistentes aos fungicidas utilizados no mercado.

Nenhum isolado foi considerado adaptado para o grupo IQe, sendo necessário coletar mais isolados de diferentes localidades para ter maior variabilidade de resposta e atender ao objetivo do estudo.

O grupo químico IDM foi introduzido no mercado a partir de 1970 (BRENT; HOLLOWON, 2007) e vem sendo utilizado regularmente até a atualidade. Fungicidas do grupo IDM são considerados de médio risco de resistência (BRENT; HOLLOWON, 2007) e, desde a sua liberação mais de 40 isolados resistentes ao grupo químico foram descritos (FRAC, 2020).

A resistência de fungos aos fungicidas IDM é descrita como quantitativa (GHINI; KIMATI, 2000; REIS; REIS; CARMONA, 2010), e é caracterizada por redução gradativa da eficácia de fungicidas à medida que ocorre aumento gradativo de CE50. Valores maiores de CE50 podem indicar menor sensibilidade do fungo ao fungicida.

Dos 39 isolados testados, os valores de CE50 para o fungicida prothioconazol variaram de 0,02 ppm (Nr 148, 1983) a 1,39 ppm (Nr 424), com média de 0,36 ppm (Tabela 3). Os valores de CE50 para o fungicida tebuconazol variaram de 0,04 (CG 1435, 2020) a 3,11 ppm (Nr 152, 1996), com média de 1,01 ppm.

Os isolados menos sensíveis ao grupo químico IDM, com CE50 superiores a 1 ppm, foram Nr 424 (2003) para o fungicida prothioconazol e para o fungicida tebuconazol os isolados Nr 10 (1990), Nr 27 (1990), Nr 66 (1992), Nr 141 (1993), Nr 148 (1983), Nr 149 (1998), Nr 152 (1996), Nr 174 (1999), Nr 250 (1999), Nr 304 (1999), Nr 424 (2003), Nr 489 (2001), Nr 553 (2007), Nr 557 (2008), Nr 604 (2018), Nr 607 (2018), Nr 612 (2021), CG 1251 (2013), totalizando 18 isolados para tebuconazol (Tabela 3).

Xavier et al. (2015), analisando 98 isolados de ferrugem coletados de 2008/09 a 2010/11, observaram que as CE50 variaram de 0,000001 a 0,39 ppm e 0,001 a 1,49 ppm para os fungicidas prothioconazol e tebuconazol, respectivamente. No presente experimento, os valores de CE50 foram maiores do que os encontrados por Xavier et al. (2015) para o fungicida prothioconazol (1,39 ppm, Nr 424, 2003) e para tebuconazol (3,11 ppm, Nr 152, 1996), podendo estar associados a menor sensibilidade do fungo ao grupo IDM.

**Tabela 3** Concentração efetiva (em ppm) para redução de 50% da germinação de esporos (CE50)  $\pm$  intervalo de confiança de 95% (IC), de populações de *Metarhizium rileyi* aos ingredientes ativos protioconazol e tebuconazol.

Isolados	Ano	CE50 protioconazol $\pm$ IC		CE50 tebuconazol $\pm$ IC	
		Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1	Experimento 2
Nr 10	1990	0,37 $\pm$ 0,19	0,34 $\pm$ 0,13	2,02 $\pm$ 0,07	1,29 $\pm$ 0,11
Nr 27	1990	0,19 $\pm$ 0,44	0,63 $\pm$ 0,65	1,73 $\pm$ 0,13	1,85 $\pm$ 0,04
Nr 32	1990	0,27 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,03	0,92 $\pm$ 0,05
Nr 66	1992	0,43 $\pm$ 0,37	0,21 $\pm$ 2,69	0,90 $\pm$ 0,05	1,33 $\pm$ 0,06
Nr 135	1998	0,16 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,10	1,02 $\pm$ 0,09
Nr 141	1993	0,85 $\pm$ 0,62	0,19 $\pm$ 0,02	1,27 $\pm$ 0,05	1,36 $\pm$ 0,04
Nr 148	1983	0,02 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,04	1,06 $\pm$ 0,03	1,31 $\pm$ 0,04
Nr 149	1998	0,63 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,25	1,99 $\pm$ 0,02	1,85 $\pm$ 0,05
Nr 152	1996	0,87 $\pm$ 0,70	0,76 $\pm$ 0,17	3,11 $\pm$ 0,18	2,69 $\pm$ 0,16
Nr 174	1999	0,60 $\pm$ 0,11	0,56 $\pm$ 0,15	1,49 $\pm$ 0,06	0,63 $\pm$ 0,07
Nr 250	1999	0,55 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,03	1,53 $\pm$ 0,09	1,14 $\pm$ 0,13
Nr 254	1999	0,31 $\pm$ 0,08	0,35 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,10
Nr 304	1999	0,19 $\pm$ 0,43	0,14 $\pm$ 0,15	1,76 $\pm$ 0,03	1,71 $\pm$ 0,06
Nr 378	2001	0,69 $\pm$ 0,72	0,13 $\pm$ 0,10	0,08 $\pm$ 0,007	0,09 $\pm$ 0,08
Nr 424	2003	1,39 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,25	1,98 $\pm$ 0,12	1,82 $\pm$ 0,03
Nr 449	2003	0,15 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,02	NA
Nr 455	2003	0,33 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,67	0,95 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,17
Nr 489	2001	0,33 $\pm$ 2,60	0,27 $\pm$ 0,89	1,50 $\pm$ 0,04	1,46 $\pm$ 0,05
Nr 494	2006	0,28 $\pm$ 0,08	0,67 $\pm$ 0,59	0,81 $\pm$ 0,10	0,98 $\pm$ 0,05
Nr 495	2006	0,21 $\pm$ 0,83	0,21 $\pm$ 0,93	0,58 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,70
Nr 553	2007	0,83 $\pm$ 0,08	0,26 $\pm$ 0,03	1,60 $\pm$ 0,27	1,49 $\pm$ 0,05
Nr 557	2008	0,09 $\pm$ 0,005	0,41 $\pm$ 0,95	1,32 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,05
Nr 600	2018	0,06 $\pm$ 0,21	0,08 $\pm$ 0,10	0,31 $\pm$ 0,12	0,71 $\pm$ 0,20
Nr 601	2018	0,08 $\pm$ 0,16	0,44 $\pm$ 0,70	0,92 $\pm$ 0,14	0,66 $\pm$ 0,14
Nr 604	2018	0,29 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,06	0,92 $\pm$ 0,21	1,49 $\pm$ 0,08
Nr 605	2018	0,23 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,14	0,63 $\pm$ 0,24
Nr 606	2018	0,45 $\pm$ 0,07	0,21 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,17
Nr 607	2018	0,76 $\pm$ 1,15	0,15 $\pm$ 0,03	0,81 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,20
Nr 608	2018	0,09 $\pm$ 0,09	0,12 $\pm$ 0,14	0,24 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,62
Nr 611	2021	0,90 $\pm$ 0,08	0,76 $\pm$ 0,82	0,64 $\pm$ 0,10	1,11 $\pm$ 0,14
Nr 612	2021	0,20 $\pm$ 0,49	0,11 $\pm$ 0,05	1,10 $\pm$ 0,01	1,16 $\pm$ 0,18
CG 1247	2013	0,62 $\pm$ 0,39	0,08 $\pm$ 0,12	0,65 $\pm$ 0,13	0,81 $\pm$ 1,22
CG 1250	2013	0,32 $\pm$ 1,12	0,08 $\pm$ 0,14	0,13 $\pm$ 0,11	0,51 $\pm$ 0,17
CG 1251	2013	0,35 $\pm$ 0,12	0,27 $\pm$ 0,10	0,67 $\pm$ 0,09	1,54 $\pm$ 0,04
CG 1252	2013	0,34 $\pm$ 0,16	0,06 $\pm$ 0,10	0,56 $\pm$ 0,07	0,21 $\pm$ 0,03
CG 1416	2019	0,14 $\pm$ 0,09	0,29 $\pm$ 0,28	1,04 $\pm$ 0,24	0,47 $\pm$ 0,33
CG 1417	2019	0,67 $\pm$ 0,19	0,32 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,10	0,58 $\pm$ 0,16
CG 1435	2020	0,68 $\pm$ 1,81	0,10 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,07	0,04 $\pm$ 0,21
CG 1457	2021	0,34 $\pm$ 0,07	0,23 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,35	0,23 $\pm$ 0,05

Não analisado (NA)

Regressão em Log-logistic em branco, em amarelo dados foram ajustados para modelo de Weibull.

Os fungos entomopatogênicos possuem grande variabilidade genética podendo ter alta variabilidade de sensibilidade. Matcha et al. (2021) relataram inibição completa do crescimento de um isolado de *M. rileyi* pelo fungicida propiconazol e somente 12,4% pelo fungicida tebuconazol, na concentração de 1 ppm. Sosa-Gómez et al. (2003) observaram que epizootias de *M. rileyi* foram atrasadas de 2 a 14 dias no controle de populações de *Anticarsia gemmatalis* quando aplicado o ingrediente ativo difenoconazol, com densidade de lagartas 63% maior que a testemunha sem fungicida.

O uso dos fungicidas IDM somente em mistura, favoreceu a menor pressão de seleção para obtenção de isolados de *M. rileyi* com maiores CE50. Com a menor sensibilidade do fungo *Phakopsora pachyrhizi* a esse grupo, o registro dos ingredientes ativos isolados foram suspensos, passando a ser recomendadas somente misturas com diferentes modos de ação (FRAC, 2020).

O desenvolvimento de resistência múltipla pode ocorrer, mas, é menos provável de se desenvolver do que se os dois ingredientes ativos fossem usados separadamente e repetidamente (BRENT; HOLLOMON, 2007). Lopes et al. (2022), analisando um isolado de *M. rileyi* (CG1153) para as misturas de ingredientes ativos trifloxistrobina + protioconazol e azoxistrobina + benzovindiflupir, na concentração de 0,1 ppm, observaram inibição completa da germinação dos conídios do fungo. Os mesmos autores, observaram em experimentos a campo, utilizando os mesmos fungicidas, redução de 30% a 40% na mortalidade das lagartas em comparação com a testemunha sem fungicida. Assim, a utilização de misturas favorece a menor seleção de populações com maiores valores de CE50 entre os isolados avaliados.

O constante monitoramento do fungo *Metarhizium rileyi* é essencial para a obtenção de isolados que possuam resistência cruzada entre os diferentes grupos químicos usados a campo. Futuros trabalhos deverão buscar isolados mais recentes, buscando encontrar resistência para os grupos químicos mais recentes, como os inibidores da quinona externa (IQe) e os inibidores da succinato desidrogenase (SDHI).

Para futuros experimentos deve-se buscar ampliar a coleção de isolados de *M. rileyi*, com coletas em diferentes locais e também a seleção de isolados em condições controladas, com cultivo em doses crescentes de fungicidas aos ativos onde foram altamente sensíveis, como o caso dos IQe.

### 3.6 Conclusões

A resistência a carbendazim foi a prevalente nos isolados avaliados, estando presente em 36 dos 37 isolados. Não foi encontrado nos isolados avaliados resistência aos ingredientes ativos picoxistrobina e azoxistrobina.

Somente um isolado (Nr 424, 2003) apresentou CE50 acima de 1 ppm para o ingrediente ativo prothioconazol e 18 isolados para tebuconazol, sendo cinco obtidos antes de 1996, ano de recomendação das primeiras aplicações de fungicidas para o controle de doenças na cultura da soja, e 13 entre os anos de 1998 e 2021. Um único isolado apresentou CE50 superior a 2 ppm (Nr 152, 1996).

#### 4 REFERÊNCIAS

- ACHEAMPONG, M. A.; HILL, M. P.; MOORE, S. D.; COOMBES, C. A. UV sensitivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates under investigation as potential biological control agents in South African citrus orchards. **Fungal Biology**, v. 124, n. 5, p. 304–310, 2020.
- AGROFIT, 2021. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) Acesso em: 4 jul. 2021.
- ANKE, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. **Canadian Journal Of Botany**, v. 73, n. 1, p. 940–945, 1995.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE SOJA**. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2018.
- ANVISA. **Carbendazim: Anvisa concluiu processo de reavaliação e mantém o banimento**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/carbendazim-anvisa-concluiu-processo-de-reavaliacao-e-mantem-o-banimento>. Acesso em: 5 jul. 2022.
- AZEVEDO, J. L. **A pesquisa agropecuária no Brasil**. Série Ciência e Tecnologia no Brasil, Escola de Administração de Empresas de São Paulo/ FGV, p. 63, 1993.
- BARTLETT, D. W.; GODWIN, J. R.; CLOUGH, J. M.; HALL, A. A.; HAMER, M; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**. v. 58, n. 7, p. 649–662, 2002.
- BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. Cross-Resistance between Cry1 Proteins in Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) May Affect the Durability of Current Pyramided Bt Maize Hybrids in Brazil. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2015.
- BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OMOTO, C. **Manejo da resistência de insetos a plantas Bt**. Engenheiro Coelho: Promip Holding S.A., 2016. 45 p.
- BORÉM, A. Escape gênico: os riscos do escape genética da soja no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 10, p. 101–107, 1999.
- BOUCIAS, D. G. PENDLAND, J. C.; LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect Cuticule. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1795–1805, 1988.
- BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C.; LATGE, J. P. Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycoses in arthropod hosts. In: COLE, G. T.; HOCH, H. C. **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, p. 101–128, 1991.



DEKKER, J. How to detect and measure fungicide resistance. In: KRANZ, J.; ROTEM J. **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Berlin: Springer, 1987. p. 153–163.

DEVI, U. K.; REINEKE, A.; RAO, U. C. M.; REDDY, N. R. N.; KHAN, A. P. A. AFLP and single-strand conformation polymorphism studies of recombination in the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Mycological Research**, v. 111, n. 6, p. 716–725, 2007.

FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. **FRAC Recommendations for SBI Fungicides**. Disponível em: <https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/sbi-fungicides/recommendations-for-sbi>. Acesso em: 08 ago. 2020.

FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. **Summary of annual Sensitivity Monitoring**. 2021. Disponível em: <https://www.frac.info/knowledge-database/summaryof-annual-monitoring>. Acesso em: 27 ago. 2021.

FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. **Quinone ‘outside’ inhibitor (QoI) Working Group**. Disponível em: [https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/qoi-fungicides/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2022-qoi-wg-meeting-and-recommendations-for-2022-on-20th-of-jan-update-april-2022.pdf?sfvrsn=1e114e9a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/qoi-fungicides/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2022-qoi-wg-meeting-and-recommendations-for-2022-on-20th-of-jan-update-april-2022.pdf?sfvrsn=1e114e9a_2). Acesso em: 08 jul. 2022a.

FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. **Background Information on Benzimidazoles**. Disponível em: <https://www.frac.info/frac-teams/expert-fora/benzimidazoles/information>. Acesso em: 24 ago. 2022b.

FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. **STEROL BIOSYNTHESIS INHIBITOR (SBI) WORKING GROUP**. Disponível em: [https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/sbi-fungicides/group/minutes-of-the-2022-sbi-telco-meeting-recommendations-for-2022-from-april-8th-2022.pdf?sfvrsn=db114e9a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/sbi-fungicides/group/minutes-of-the-2022-sbi-telco-meeting-recommendations-for-2022-from-april-8th-2022.pdf?sfvrsn=db114e9a_2). Acesso em: 18 set. 2022c.

FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. How does Fungicide Resistance evolve? Disponível em: <https://www.frac.info/fungicide-resistance-management/background>. Acesso em: 20 fev. 2023.

GAZZONI, D. L. **A sustentabilidade da soja no contexto do agronegócio brasileiro e mundial**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 50p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 344).

GEORGOPOULOS, S. G.; SKYLAKAKIS, G. Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance. **Crop Protection**, v. 5, n. 5, p. 299–305, 1986.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GISI, U.; CHIN, K. M.; KNAPOVA, G.; KÜNG FÄRBER, R.; MOHR, U.; PARISI, S.; SIEROTZKI, H.; STEINFELD, U. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. **Crop Protection**, v. 19, n.

8–10, p. 863–872, 2000.

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M. **Ferrugem-asiática da soja**: bases para o manejo da doença e estratégias antirresistência. Londrina: Embrapa Soja, 2020. 39 p. (Embrapa Soja. Documentos, 428).

GOETTEL, M. S.; INGLIS, G. D.; WRAIGHT, S. P. Fungi. In: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Springer, p. 255–282, 2000.

GÖSSWALD, K. Über den insektentötenden Pilz *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Bisher bekanntes und eigene Versuche. Arbeitsgemeinsc. **Biologische Reichsanstalt** v.22, p. 399–452, 1938.

HALL, I. M.; DUNN, P. H. The effect of certain insecticides and fungicides on fungi pathogenic to the spotted alfalfa aphid. **Journal of Economic Entomology**, v. 52, n. 1, p. 28–29, 1959.

HEWITT, H. G. **Fungicides in Crop Protection**. CAB International, New York, NY, 1998.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 70 p. (Embrapa Soja. Documentos, 349).

HOLLOMON, D. K. Fungicide Resistance: 40 years on and still a major problem. In: ISHII H., HOLLOMON D., editors. Fungicide resistance in plant pathogens: **Principles and a Guide to Practical Management**. Japan: Springer, 2015. p. 119–143.

HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; GODOY, D. N.; SEMEÃO, A. A.; WILLSE, A.; CORAZZA, G. O.; RUTHES, E.; FERNANDES, D. de S.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; BUENO, A. de F. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701 × MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2021.

HUMBER, R. A.; HANSEN, K. S.; WHEELER, M. M. Catalog of species. Ithaca, NY: ARSef ARS **Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures**, 2011. p. 517.

IGNOFFO, C. M.; MARSTON, N. L.; HOSTETTER, D. L.; PUTTLER, B.; BELL, J. V. Natural and induced epizootics of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 27, n. 2, p. 191–198, 1976.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; BUTT, T. M.; STRASSER, H. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T. M.; JACKSON C. W.; MAGAN, N. **Fungi as biocontrol agents**: progress, problems and potential. Bristol: Cabi Publishing, p. 23–70, 2001.

- KEPLER, R. M.; HUMBER, R. A.; BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, v. 106, n. 4, p. 811–829, 2014.
- KISH, L. P.; SAMSON, R. A.; ALLEN, G. E. The genus *Nomuraea* Maublanc. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 24, n. 2, p. 154–158, 1974.
- KLOSOWSKI, A. C.; BRAHM, L.; STAMMLER, G.; MIO, L. L. M. de. Competitive fitness of *Phakopsora pachyrhizi* isolates with mutations in the CYP51 and CYTB Genes. **Phytopathology**, v. 106, n. 11, p. 1278–1284, 2016.
- KOENRAADT, H.; JONES, A. L. The use of allele-specific oligonucleotide probes to characterize resistance to benomyl in field strains of *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, v. 82, n. 11, p. 1354–1358, 1992.
- KOS, K.; A CELAR, F. Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. to selected herbicides. **Pest Management Science**, v. 69, n. 6, p. 717–721, 2012.
- KUS, C.; ALTANLAR, N. Synthesis of some new benzimidazole carbamate derivatives for evaluation of antifungal activity. **Turkish Journal of Chemistry**, n. 27, p. 35–39, 2003.
- LIANG, H.; LI, J.; LUO, C.; LI, J.; ZHU, F. Effects of SHAM on the Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* to QoI Fungicides. **Plant Disease**, v. 103, n. 8, p. 1884–1888, 2019.
- LISZBINSKI, B. B.; DE MELLO, E. S.; BRIZOLLA, M. M. B.; BRUM, A. L.; PATIAS, T. Z.; BAGGIO, D. K. Sustainability in soybean production from the perspective of the producers. **Journal of management and sustainability**, v. 10, n. 1, p.138-151, 2020.
- LOPES, R. B.; FARIA, M.; SOUZA, D. A.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Potential Impact of Chemical Fungicides on the Efficacy of *Metarhizium rileyi* and the Occurrence of *Pandora gammae* on caterpillars in soybean crops. **Microbial Ecology**, p. 1–11, 2022.
- LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. The Evolution of fungicide resistance. **Advances in Applied Microbiology**, v.90, p. 29–92, 2015.
- MA, Z. MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, p. 853–863, 2005.
- MALATHRAKIS, N. E.; VAKALOUNAKIS, D. J. Resistance to benzimidazole fungicides in the gummy stem blight pathogen *Didymella bryoniae* on cucurbits. **Plant Pathology**, v. 32, n. 4, p. 395–399, 1983.

MATCHA, N.; DURAIMURUGAN P.; BHOWMICK A. K. Effect of insecticides and fungicides on growth and sporulation of *Metarhizium rileyi* (Farlow) Samson. **The Pharma Innovation Journal**, v. 7, n. 10, p. 1444–1447, 2021.

MAUBLANC, A. Sur quelques espèces nouvelles de champignons inférieurs. **Soc. Mycol. France**, v.19, p. 291–296, 1903.

MCGRATH, M. T. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: experiences and challenges. **Plant Disease**, v. 85, n. 3, p. 236–245, 2001.

MELLO, F. E.; LOPES-CAITAR, V. S.; PRUDENTE, H.; XAVIER-VALENCIO, S. A.; FRANZENBURG, S.; MEHL, A.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; VERREET, J.; BALBI-PEÑA, M. I.; GODOY, C. V. Sensitivity of *Cercospora spp.* from soybean to quinone outside inhibitors and methyl benzimidazole carbamate fungicides in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, n. 1, p. 69–80, 2021.

MOHAMED, A. K. A.; SIKOROWSKI, P. P.; BELL, J. V. Histopathology of *Nomuraea rileyi* in larvae of *Heliothis zea* and in vitro enzymatic activity. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 31, n. 3, p. 345–352, 1978.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMAN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMAN-CAMPO. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa, 2013. p. 213–334.

NIASSY, S.; MANIANIA, N.K.; SUBRAMANIAN, S.; GITONGA, M.L.; MARANGA, R.; OBONYO, A.B.; EKESI, S. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* isolate ICIPE 69 with agrochemicals used in French bean production. **International Journal of Pest Management**, v. 58, n. 2, p. 131–137, 2012.

OEPP/EPPO. EPPO Standard PP1/213, Resistance risk analysis. **OEPP/ EPPO Bulletin 29**, v. 29, n. 1, p. 325–347, 1999.

OLMERT, I.; KENNETH, R. G. Sensitivity of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, and *Verticillium sp.* to fungicides and insecticides. **Environmental Entomology**, v. 3, n. 1, p. 33–38, 1974.

PEKRUL, S.; GRULA, E. A. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 34, n. 3, p. 238–247, 1979.

PESSOA, L. G. A.; LOUREIRO, E. S.; YOKOTA, L. A.; ROCHA, C. M. D.; SALES, A. C.; DIAS, B. M. R.; PEREIRA FILHO, A. A. Efeito de fungicidas ao fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. 1–8, 2021.

PRESLY, A. H.; MAUDE, R. B. Control of *Botrytis cinerea* and *Botrytis squamosa* in overwintered salad onions by fungicide sprays. **Annals of Applied Biology**, v. 94, n. 2, p. 197–204, 1980.

PRICE, P. P.; PURVIS, M. A.; CAI, G.; PADGETT, G. B.; ROBERTSON, C. L.; SCHNEIDER, R. W.; ALBU, S. Fungicide resistance in *Cercospora kikuchii*, a soybean pathogen. **Plant Disease**, v. 99, n. 11, p. 1596–1603, 2015.

R CORE TEAM, 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RAMOS, C. N.; NASCIMENTO, L. S.; SILVA, M. N. Biodiesel obtido através de resíduos: energia limpa que vem dos restos. **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, p. 151–156, 2010.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, n. 23, p. 77–83, 2004.

REIS, E. M.; MEDEIROS, C. A.; CASA, R. T. Epidemia de oídio da soja, causada por *Microsphaera diffusa*, na safra 1996/97, no RS. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p. 300–301, 1977.

REIS, E. M.; REIS, A. C.; CARMONA, M. A. **Manual de fungicidas**: guia para o controle químico de doenças de plantas. 6. Ed. Passo Fundo. Ed. Universidade de Passo Fundo, 2010. 226 p.

RUSSELL, P. E. **Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management**. Brussels, Belgium: Crop Life International, 2002.

SCHMITZ, H. K.; MEDEIROS, C. A.; CRAIG, I. R.; STAMMLER, G. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinine-outside-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, n.70, v.3, p.378–88, 2014.

SCHREINER, V. C.; SZÖCS, E.; BHOWMIK, A. K.; VIJVER, M. G.; SCHÄFER, R. B. Pesticide mixtures in streams of several European countries and the USA. **Science of the Total Environment**, v. 573, p. 680–689, 2016.

SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; GODOY, C. V.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M.; DIAS, W. P.; ALMEIDA, A. M. R. Manejo de doenças. In: SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F.C.; LEITE, R; M. V. B. de C. (Ed). **Tecnologias de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. p. 227–264. (Embrapa Soja. Sistema de Produção, 17).

SHAHID, N.; LIESS, M.; KNILLMANN, S. Environmental Stress Increases Synergistic Effects of Pesticide Mixtures on *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, v. 53, n. 21, p. 12586-12593, 2019.

SILVA, R. A.; QUINTELA, E. D.; MASCARIN, G. M.; BARRIGOSI, J. A. F.; LIÃO, L. M. Compatibility of conventional agrochemicals used in rice crops with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 3, p. 152–160, 2013.

SILVA JUNIOR, G.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: princípios e controle**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2018. p. 239–260.

SIMÕES, K.; HAWLIK, A.; REHFUS, A.; GAVA, F.; STAMMLER, G. First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 125, n. 1, p. 21–26, 2017.

SIEROTZKI, H. Respiration Inhibitors: Complex III. In: ISHII H., HOLLOMON D., editors. **Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management**. Japan: Springer, 2015. p. 119–143.

SKINNER, M.; PARKER, B. L.; KIM, J. S. Role of entomopathogenic fungi in integrated pest management. In: ABROL, D. P. (ed.). **Integrated Pest Management: current concepts and ecological perspective**. San Diego: Elsevier, 2014. p. 169–192.

SOPER, R. S.; HOLBROOK, F. R.; GORDON, C. C. Comparative pesticide effects on *Entomophthora* and the phytopathogen *Alternaria solani*. **Environmental Entomology**, v. 3, n. 3, p. 560–562, 1974.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; DELPIN, K. E.; MOSCARDI, F.; NOZAKI, M. H. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: noctuidae), on soybean. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2, p. 287–291, 2003.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; LASTRA, C. C. López; HUMBER, R. A. An Overview of Arthropod-Associated Fungi from Argentina and Brazil. **Mycopathologia**, v. 170, n. 1, p. 61–76, 2010.

STAMMLER, G.; BENZINGER, G.; SPEAKMAN, J. A Rapid and reliable method for monitoring the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to boscalid. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 11–12, p. 746–748, 2007.

SUWANNAKUT, S.; BOUCIAS, D. G.; WIWAT, C. Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 90, n. 3, p. 169–176, 2005.

TERAMOTO, A.; MEYER, M. C.; SUASSUNA, N. D.; CUNHA, M. G. In vitro sensitivity of *Corynespora cassiicola* isolated from soybean to fungicides and field chemical control of target spot. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 4, p. 281–289, 2017.

TIGANO-MILANI, M. S.; FARIA, M. R. de.; LEUCONA, R. E.; SARTORI, M. R.; ARIMA, E. Y.; DIAZ, B. M.; DE FARIA, M. R. Analysis of pathogenicity and germination of the fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolated in Federal District. **Anais da Sociedade Entomol. do Brasil**, v.24, p. 53–60, 1995.

URS, N. V. R.; GOVINDU, H. C.; SHASTRY, K. S. S. The effect of certain

insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, n. 3, p. 398–403, 1967.

VAN DEN BOSCH, R. Biological Control of Insects. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Berkley, v. 2, n. 1, p. 45–66, 1971.

VEGA, B.; LIBERTI, D.; HARMON, P. F.; DEWDNEY, M. M. A rapid resazurin-based microtiter assay to evaluate Qol sensitivity for *Alternaria alternata* isolates and their molecular characterization. **Plant Disease**, v. 96, n. 9, p. 1262–1270, 2012.

WALKER, A.; MICOUD, A.; RÉMUSON, F.; GROSMAN, J.; GREDT, M.; LEROUX, P. French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). **Pest Management Science**, v. 69, n. 6, p. 667–678, 2013.

WEBER, R. W. S.; HAHN, M. A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. **Journal of Plant Diseases And Protection**, v. 118, n. 1, p. 17–25, 2011.

XAVIER, S. A.; CANTERI, M. G.; BARROS, D. C. M.; GODOY, C. V. Sensitivity of *Corynespora cassiicola* from soybean to carbendazim and prothioconazole. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 431–435, 2013.

XAVIER, S. A.; BARROS, D. C. M.; CANTERI, M. G.; GODOY, C. V., LOPES, I. O. N. Variação da sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas inibidores da desmetilação no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.3, p.191–196, 2015.

YORINORI, J. T.; MOREL, W.; FERNANDEZ, F. T. P. Epidemia de ferrugem de Soja no Paraguai e na Costa Oeste do Paraná, em 2001. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 23., 2001, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p.117-118. (Embrapa Soja. Documentos, 157).

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. L.; GODOY, C. V.; NUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay. **Plant Disease**, v. 89, p. 675–677, 2005.

YOUNG, D. H. Anti-tubulin agents. In: ISHII H.; HOLLON D. (Eds.) **Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management**. Japan: Springer, 2015. p. 119–143.

ZIOGAS, B. N.; MALANDRAKIS, A. A. Sterol Biosynthesis Inhibitors: C14 Demethylation (DMIs). In. ISHII H., HOLLON D., editors. **Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management**. Japan: Springer, Tokyo, 2015. p. 201–216.